

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 02-002364
(43)Date of publication of application : 08.01.1990

(51)Int.Cl. C12N 15/53
C12N 1/21
C12P 7/54
//(C12N 15/53
C12R 1:02)
(C12N 1/21
C12R 1:02)
(C12P 7/54
C12R 1:02)

(21)Application number : 01-033775 (71)Applicant : NAKANO VINEGAR CO LTD
(22)Date of filing : 15.02.1989 (72)Inventor : FUKAYA MASAHIRO

(71)Applicant : NAKANO VINEGAR CO LTD

(72)Inventor : FUKAYA MASAHIRO

TAYAMA KENJI

TAMAOKI TOSHIMI

TAGAMI HARUKO

OKUMURA HAJIME

KAWAMURA KICHIY

.....

(30)Priority

Priority number : 63 52709 Priority date : 08.03.1988 Priority country : JP

(54) STRUCTURAL GENE OF CELL MEMBRANE BONDING TYPE ALDEHYDE DEHYDROGENASE, PLASMID CONTAINING THE SAME, TRANSFORMED ACETIC ACID BACTERIUM AND METHOD FOR FERMENTING ACETIC ACID

(57)Abstract:

PURPOSE: To enhance content of an enzyme in a cell as well as efficiency of fermentation and enable efficient production of a desired acid by isolating a structural gene of cell membrane bonding type aldehyde dehydrogenase and integrating the isolated gene into a plasmid.

CONSTITUTION: A microorganism belonging to the genus *Acetobacter* or *Gluconobacter* is transformed by a plasmid containing a structural gene of a cell membrane bonding type aldehyde dehydrogenase derived in a microorganism of the genus *Acetobacter* and having about 3.6 kilo base molecular size and fermentation is carried out using the transformed microorganism to provide the acid, especially acetic acid. The map of restriction enzyme of the structural gene is shown in the figure.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑩ 特許出願公開

⑪ 公開特許公報 (A)

平2-2364

⑫ Int. Cl.
C 12 N 15/53
1/21
C 12 P 7/54

識別記号
ZNA

庁内整理番号

⑬ 公開 平成2年(1990)1月8日

6926-4B※

審査請求 未請求 請求項の数 6 (全12頁)

⑭ 発明の名称 細胞膜結合型アルデヒド脱水素酵素の構造遺伝子、これを含むプラスミド、形質転換した酵酸菌及び酵酸発酵法

⑮ 特願 平1-33775

⑯ 出願 平1(1989)2月15日

優先権主張 ⑰ 昭63(1988)3月8日 ⑮ 日本 (JP) ⑯ 特願 昭63-52709

⑰ 発明者 深谷 正裕 愛知県知多郡東浦町森岡字濁池1-28

⑰ 発明者 多山 賢二 愛知県半田市堀崎町2-17 コープ野村半田2-201

⑰ 発明者 玉置 敏視 愛知県半田市荒古町1-22

⑰ 発明者 田上 暖子 愛知県常滑市青海町3-67

⑰ 発明者 奥村 一 愛知県半田市岩滑東町5丁目68-14

⑯ 出願人 株式会社中埜酢店 愛知県半田市中村町2丁目6番地

⑰ 代理人 弁理士 戸田 親男

最終頁に続く

明細書

1. 発明の名称

細胞膜結合型アルデヒド脱水素酵素の構造遺伝子、これを含むプラスミド、形質転換した酵酸菌及び酵酸発酵法

2. 特許請求の範囲

1. アセトバクター属の微生物に由来し、分子サイズが約3.6キロベースであり、制限酵素地図が第1図で示される細胞膜結合型アルデヒド脱水素酵素の構造遺伝子。
2. アセトバクター属の微生物に由来し、分子サイズが約3.6キロベースであり、制限酵素地図が第1図で示される細胞膜結合型アルデヒド脱水素酵素の構造遺伝子を含むプラスミド。
3. アセトバクター属の微生物に由来し、分子サイズが約3.6キロベースであり、制限酵素地図が第1図で示される細胞膜結合型アルデヒド脱水素酵素の構造遺伝子を含むプラスミドによって形質転換した酵酸菌。
4. アセトバクター属の微生物に由来し、分子サ

イズが約3.6キロベースであり、制限酵素地図が第1図で示される細胞膜結合型アルデヒド脱水素酵素の構造遺伝子を含むプラスミドによって形質転換したアセトバクター属またはグルコノバクター属の微生物を用いて酵酸発酵せしめることを特徴とする酵酸発酵法。

5. アセトバクター属の微生物に由来し、第3図の塩基配列で示される細胞膜結合型アルデヒド脱水素酵素の構造遺伝子。

6. アセトバクター属の微生物に由来し、第3図のアミノ酸配列で示される細胞膜結合型アルデヒド脱水素酵素の構造遺伝子。

3. 発明の詳細な説明

【産業上の利用分野】

本発明はアセトバクター属の微生物に由来する細胞膜結合型アルデヒド脱水素酵素の構造遺伝子、これを含むプラスミドおよびその利用に関するものである。

アセトバクター属に属する微生物の生産する細胞膜結合型アルデヒド脱水素酵素は、ピロロキノ

特開平2-2364 (2)

リンキノンを補欠分子量とし、アルデヒドを対応する酸に酸化する酵素である。該酵素は、酢酸発酵でのエタノールから酢酸を生成する酸化発酵に関与しており、また、アルデヒドの定量や食品の不快臭の原因物質であるアルデヒドの酸化分解に利用され、産業上有用な酵素である。

また、該酵素を菌体内に多量産生する酵素菌は酢酸発酵の速度が速くなり、酢酸の生産効率を高めることができるので、本発明は酢酸発酵界に益するところ大なるものがある。

〔従来の技術及び問題点〕

従来、細胞膜結合型アルデヒド脱水素酵素は、アセトバクター属やグルコノバクター属の微生物を培養し、培養菌体そのまま又は菌体から抽出精製され利用されてきた（アグリカルチュラル・アンド・バイオロジカル・ケミストリー、第44巻、第503頁、1980年、第45巻、第1889頁、1981年）。

しかし、該酵素は、菌体中の含量が低く、また不安定な酵素であるため、抽出精製の操作中に失活してしまい、十分な收率で精製できず、多量に

調製することが困難であった。一方、変異処理により、菌体中の酵素含量の高くなった変異株を取得することも考えられるが、いまだ十分量の酵素含量に達しているとの報告はない。

〔問題点を解決するための手段〕

本発明者らは、上述した問題点を解決するため、遺伝子組み換え技術により菌体中の酵素含量を高める方法を試行検討した結果、細胞膜結合型アルデヒド脱水素酵素の構造遺伝子を単離し、プラスミドに含ませることに成功した。さらに単離した遺伝子を含むプラスミドを用いることにより、該酵素の菌体内含量を高め、酢酸発酵の効率を高めることができることを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明はアセトバクター属の微生物に由来し、分子サイズが約3.8キロベースである細胞膜結合型アルデヒド脱水素酵素の構造遺伝子を含むプラスミドおよび該プラスミドによって形質転換されたアセトバクター属またはグルコノバクター属の微生物に関する、更には該微生物を用い

〔酢酸発酵する方法に関するもの〕

本発明における細胞膜結合型アルデヒド脱水素酵素（以下ALDHと略）は特開昭63-12279に記載される新規なアルデヒドデヒドロゲナーゼ複合体で、分子量が約75,000の蛋白質をさし、アルデヒドデヒドロゲナーゼ複合体の活性の本体をなす酵素である。該酵素は、アセトバクター・アルトアセテゲネスMH-24(PBRM BP-491)に代表される一群のアセトバクター属の微生物によって生産される。該酵素の構造遺伝子を含む遺伝子断片は、該酵素を生産するアセトバクター属の微生物の保有する全DNAから単離することができる。全DNAは、例えば特開昭60-9489に開示された方法により、調製することができる。この全DNAから、たとえば、実施例1に示されているような方法、すなわち該酵素に対する抗体を調製し、抗原抗体反応を利用して目的の遺伝子をもつクローニングを選択する方法などにより、ALDH構造遺伝子を含む遺伝子断片を単離することができる。

該酵素に対する抗体は、特開昭63-12279に開示

された方法により、精製されたアルデヒドデヒドロゲナーゼ複合体をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により、2つのサブユニットに分離後、分子量75,000に相当する蛋白質をゲルから抽出し、抗原として用いて作成することができる。具体的には、たとえば“Methods in Enzymology”第73巻、第46頁(1981年)の方法に従えば、抗ALDH抗体を得ることができる。最初の免疫から約2週間後、2回目の免疫をおこなうことにより、1ヶ月ないし1ヶ月半でALDHに特異的な抗体の生成がみられる。抗体は血清を血清分画などにより粗精製するか、さらにイオン交換クロマトグラフィーにより精製度の高い標品を調製できるが、遺伝子の単離に用いる場合には、血清を適宜希釈して使用することも可能である。

一方、全DNAを適当な制限酵素で切断したものと発現ベクターを全DNAと連結可能な制限酵素で切断したものとをT4 DNAリガーゼにより連結し、その連結物を大腸菌宿主に形質転換する。この場合の発現ベクターとしては、たとえばpUC18のよ

特開平2-2364 (3)

うな大腸菌の β -ガラクトシダーゼ遺伝子のオペレーター、プロモーターをもつベクターのプロモーターの下流に融合蛋白として生成させ、イソブロビルペータ-D-チオガラクトビラノシドにより、遺伝子の誘導発現が可能なベクターがあげられる。

大腸菌の形質転換は常法にしたがえばよいが、なるべく遺伝子導入効率の高い形質転換法（たとえば、"DNA cloning" 第1巻、第109頁、IRL Press(1985)に記載の方法）で形質転換した方が望ましい。得られた形質転換株の中から、目的とする遺伝子をもつ株の検出は、たとえば、ジーン、第37巻、第267頁(1985年)の方法に準じておこなえばよい。すなわち、得られた形質転換株の菌体抽出物を抗体と反応させ、特異的な反応性を示す株を検出することによって可能である。このようにして得られた抗体と反応性を示す株は、目的とする遺伝子全長を有する場合もあるが、遺伝子の一部しか有していない場合もある。

一部の遺伝子しか有していない場合には、さらに得られている遺伝子をプローブとしてサザン・

ハイブリダイゼーションなどの手法により、プローブと相同意を示す断片を単離することによって遺伝子全長を得ることができる。

このようにして単離したALDHの構造遺伝子を含む遺伝子断片を用いて、ALDHを生産するためには、通常遺伝子断片と宿主内で機能するプロモーター活性をもつ遺伝子とを発現可能な形で連結させる必要がある。アセトバクター属やグルコノバクター属の微生物内でALDH蛋白を生成させるために用いるプロモーターとしては、ALDH遺伝子本来のプロモーターも使用できるが、酵母由來の他のプロモーター活性をもつ遺伝子や酵母で発現可能な大腸菌のプロモーターも使用できる。大腸菌プロモーターとしては、大腸菌プラスミドpBB322のアンピシリン耐性遺伝子や大腸菌プラスミドpACYC177のカナマイシン耐性遺伝子、大腸菌プラスミドpACYC184のクロラムフェニコール耐性遺伝子、大腸菌の β -ガラクトシダーゼ遺伝子のプロモーターなどが使用できる。過剰量にALDHが生産されて宿主の生育等に影響を及ぼす場合には、遺

伝子の発現量をコントロールするため、適当なプロモーターを選択する必要がある。また、発現させた場合、本来のALDHの分子量と大きさの異なる蛋白の生成が見られる場合がある。これは、ALDH蛋白と他の蛋白が融合した融合蛋白の形で宿主内で生産されているためであるが、酵素活性が発現できるような形で融合蛋白が生成していれば、なんら差しつかえない。

また、酵母内にALDHの構造遺伝子を含む遺伝子断片を保持させるためのベクターとしては、たとえば、特開昭60-9488に開示されているpTA5001(A)、pTA5001(B)や酵母に導入可能な広宿主ベクターRP4::Mu、RP4、pRK2013、RSF1010などが利用できる。

以上のようにして、ALDHの構造遺伝子を含むプラスミドを単離することができ、形質転換した後、遺伝子を発現することにより、ALDH蛋白を菌体内に等量生産することができる。

ALDHを生産させる宿主として、大腸菌、枯草菌など遺伝子組み換え技術が確立されている微生物

を用いることもできるが、ALDHをもともと生産する能力を有する酵母、すなわちアセトバクター属およびグルコノバクター属の微生物を用いる方が有利である。

ALDHは、PQQを補欠分子族としてもっており、活性型の酵素を生産させるためには、培地等にPQQを加え、ALDH蛋白を生産させることもできるが、宿主がPQQ合成能を有している方が有利である。アグリカルチュラル・アンド・バイオロジカル・ケミストリー、第48巻、第561頁(1984年)に記載のごとく、大腸菌や枯草菌のPQQ合成能は低く、酵母の合成能力が高いことが明らかになっている。また、酵素反応を効率的に進めるためには、補欠分子族であるPQQの酸化型と還元型のリサイクリングがうまく進行することが必要で、酸化反応により生成する電子が、電子伝達系と共に投して効率よくリサイクリングしている酵母を宿主とする方が有利である。

又、酵母発酵においてALDHは、アセトアルデヒドを酵素に酸化する反応を担っている。このため、

特開平2-2364 (4)

酵酸菌体内のALDHの量を高めることにより、酵酸発酵の効率化が期待できる。実施例3に示すごとく、酵酸菌の形質転換株を用いることによりALDH活性を高めることにより、酵酸発酵の効率化ができる。

〔発明の効果〕

本発明を用いれば、従来、菌の生産性が低いため特異单離が困難であったALDHを容易に調製することができ、定量用酵素や臨床用酵素としての途を開くことができる。また、該酵素の含量の高まつた酵酸菌を用いることにより、ALDHの効率的な生産のみならず、酵酸発酵の効率化が可能となる。(実施例1)

〔抗ALDH抗体の調製法〕

アセトバクター・アルトアセチゲネスMH-24(PB RH BP-401)株をグルコース3%、エタノール4% (V/V)、酵酸6% (V/V)、酵母エキス(大五栄養化學株式会社製)0.5%、ポリペプトン(大五栄養化學株式会社製)0.2%を加えた培地で30℃にて振とう培養した。培養後、遠心分離により菌体を得た

後、常法(特開昭63-12279に開示された方法)により、ALDH複合体4mgを得た。この複合体をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、分子量約75,000の蛋白質と分子量約20,000の蛋白質とに分離後、75,000の位置にある蛋白質をゲルから溶出させ、ALDH標品とした。

得られたALDH 0.1mgを完全フロイントのアジュバントと共にウサギの皮下に注射した。約2週間後、さらに0.1mgのALDH標品を注射した。最初の注射から1ヵ月後、ウサギの血液を耳から抜きとり、遠心分離し得た血清とALDHとの反応性を見たところ、沈降反応が認められ、また、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動後、ウエスタン法にてその特異性を調べたところ、ALDH以外の蛋白との反応性はほとんど見られず、特異性の高い抗ALDH抗体が生成されていた。

〔ALDH構造遺伝子の一部の単離〕

上記と同様な方法で培養して得たアセトバクター・アルトアセチゲネスMH-24の菌体から、常法(特開昭60-9489に開示された方法)により、全DNA

を調製した。調製した全DNAを制限酵素Pst I(宝酒造株式会社製)で切断後、同じく制限酵素Pst Iで切断した後、細菌性アルカリホスファターゼ(宝酒造株式会社製)で脱リン酸化した大腸菌ベクター pUC18(宝酒造株式会社製)とT4 DNAリガーゼ(宝酒造株式会社製)を用いて連結した。連結反応液を大腸菌宿主E.coli JM 109にManahanの方法("DNA cloning."第1巻, 第108頁, IRL Press(1985年))で形質転換した後、形質転換株をアンビシリン30μg/mlの濃度で含むLB寒天培地("A Manual for Genetic Engineering."第201頁, Cold Spring Harbor Laboratory, 1980年)で選択した。この時の組み換え体の出現頻度は、約60%であった。Yanagisawa (Gene, 第37巻, 第267頁, (1985年))の方法に準じて、得られた形質転換株約5,000株について抗ALDH抗体との反応性をみた。まず、LB寒天培地上に生育させた形質転換株をニトロセルロースフィルターにレプリカし、37℃で3~5時間、フィルター上でコロニーを生育させた後、10mMのIPTG(インプロビル-β-D-チオガラクトビ

ラノシド)水溶液で温めらせpUC18のもつlacのプロモーターを誘導し、宿主大腸菌に融合蛋白を大量生産させるようにした。IPTGによる誘導を37℃で3~5時間おこなった後、フィルターをクロロホルムの蒸気につかし、コロニーを弱く溶解させた後、5mM MgCl₂、5μg/ml DNase, 0.1mg/mlのリソチームおよび0.5%のBSAを含むバッファーA(50mMトリス-塩酸, 150mM NaCl, pH7.5)中で一晩放置し、コロニーを完全に溶解させ、ニトロセルロースフィルターに菌体蛋白を吸着させ、同時にブロッキング反応をおこなった。反応終了後、バッファーAで3回フィルターを洗浄し、上記方法で調製した抗ALDH抗体を1,000倍希釈(バッファーAで希釈)。希釈液中で室温で5時間反応させた。抗体との反応終了後、フィルターをバッファーAで5回洗浄した後、抗原抗体反応の有無を検出するため、2次抗体として、バーオキシダーゼ標識した抗ウサギIgG抗体(バイオラッド社製)の2,000倍希釈液をフィルターに室温で1時間反応させた。反応後、バッファーAで3回

特開平2-2364 (5)

フィルターを洗浄し、発色剤として過酸化水素と4-クロロ-1-ナフトールを含む反応液にフィルターを浸し、発色をみた。アンビシリン耐性株約5,000株から反応性を示すコロニーが2つ得られた。これら2株のプラスミドをアルカリ培菌法(Nucleic Acids Res., 第7巻, 第1513頁, (1979年))で抽出し、制限酵素で切断し解析したところ、2株ともベクターのpUC18のPst I部位に約2.0キロベースのDNA断片を有していた。また、形質転換株をLB培地にアンビシリン30 μg/ml, IPTG10mMを加入了液培地で1喫37°Cで培養して得られた菌体を超音波破砕し、得られた菌体破砕液を上記したSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、ウエスタン法(Anal. Biochem., 第112巻, 第195頁(1981年))で抗ALDH抗体と反応する蛋白質の分子量を調べたところ、約4万の分子量の蛋白が抗体と反応した。ALDHの分子量は75,000であり、分離した遺伝子は、ALDH蛋白の約半分をコードする遺伝子であることがわかった。

(ALDH構造遺伝子全長を含む遺伝子断片の単離)

で20分間処理した。その後、この混合物に4mlのLB培地を加え、37°Cで1時間振とう培養し、培養液をアンビシリン30 μg/mlの濃度で含むLB寒天培地に塗抹した。37°Cで1喫培養し生育してきた形質転換株のうち、約1,000株について、サザンハイブリダイゼーション法でプローブとハイブリダイズするプラスミドを有する形質転換株を調べた。1,000株のうち、3株がプローブとハイブリダイズするDNAを含んでおり、そのうちの1株から、ALDHの構造遺伝子全長を含む断片のクローニングをおこなった。サザンハイブリダイゼーションにより、約10キロベースのEcoRIで切断される遺伝子断片にプローブDNA部分が存在していることから、まず約10キロベースのEcoRIで切り出される断片をpUC18をベクターとして単離した。さらに、このEcoRIで切り出される断片の制限酵素解析をおこない、Ava Iで部分分解することにより、ALDH構造遺伝子の全長を含む断片を単離した。単離した遺伝子断片は大きさ約3.8キロベースで、第1図に示すような制限酵素地図であった。この

上記の方法で得たALDHの構造遺伝子の一部を含む遺伝子(大きさ約2.0キロ・ベース)をプローブとしてサザン・ハイブリダイゼーション法(J. Mol. Biol. 第98巻, 第503頁(1975年))により、以下のようにして全長を含む遺伝子を単離した。まず、上記した方法でアセトバクター・アルトアセチゲネスHII-24の全DNAを調製し、制限酵素Bam HIで部分分解した。この時の部分分解は、分解により生成するDNA断片が、主に20~30キロベースの大きさとなるような条件でおこなった。一方、大腸菌コスミドベクターpUC79 (Gene, 第11巻, 第281頁, (1980年))をBam HIで切断し、全DNAの部分分解物とT4 DNAリガーゼにより連結した。次に連結物をイン・ビトロ・パッケージング・キット(プロメガバイオテック社製)を用いてパッケージングした。大腸菌宿主E.coli HB101をLB培地にマルトース0.2%を加入了液培地で30°Cで1喫培養し、過分増殖後、LB培地にMg Cl₂ 10mMを含む培地に菌体を懸濁した。この菌体懸濁液0.5mlにパッケージング反応物0.5mlを加え、軽く混合し、室温

遺伝子断片は、大腸菌ベクターpUC18のEcoRI-Ava I部位に組みこまれ、大腸菌宿主E.coli JM109に形質転換され、E.coli AL25菌株名で竣工研にFERM BP-2288(FERM P-8911)として寄託されている。第1図に示す遺伝子断片をpUC18のAva I部位にlacプロモーターの翻脚がかかる方向に組みこみ、E.coli JM109に上記した方法で形質転換した。形質転換株をLB培地にアンビシリン30 μg/ml, IPTG10mMを含む液培地で37°C 1喫培養した菌体をウエスタン法にて解析したところ、分子量約79,000の抗ALDH抗体と特異的に反応する蛋白を著生産していた。IPTGを加えないと特異的な蛋白の生産はみとめられなかったことから、形質転換株では、lacプロモーターの翻脚下でALDH蛋白が合成されていると認められる。又ALDHの本命の分子量よりも生産された蛋白の分子量が大きいのは、ALDH蛋白がlacプロモーターのすぐ後にある遺伝子の一部に由来する蛋白との融合蛋白の形で生産されているためと考えられる。大腸菌形質転換株のALDHの酵素活性を酵酸菌の方法(アグ

特開平2-2364(6)

リカルチュラル・アンド・バイオロジカル・ケミストリー、第44巻、第503頁、(1980年)に準じて測定したが、活性は検出できなかった。

(実施例2)

(ALDH構造遺伝子を含む遺伝子断片の酵酸菌宿主への形質転換)

実施例1で準じた第1図で示すALDHの構造遺伝子を含む遺伝子断片をpUC18のAvaI部位に、ALDH蛋白が合成されるような方向で組みこんだ。次に、アセトバクター・アセチ・サブスピーチ・キシリナムIFO 3288の有するプラスミドのうち、分子サイズ 約2.1キロベースのプラスミドを調製し制限酵素AccIで切断し、T4 DNAポリメラーゼで切断末端を平滑化した。一方、pUC18に第1図で示される遺伝子断片を組みこんだ組み換えプラスミドを制限酵素SalIで切断し、同じくT4 DNAポリメラーゼで切断末端を平滑化した。両者をT4 DNAリガーゼにより、連結し組み換え体を得た後、アセトバクター・アセチ No 1023 (FERM BP-2287 (FERM P-7122)) からアグリカルチュラル・アンド・

バイオロジカル・ケミストリー第49巻、第2485頁(1985年)に開示された方法により得られたALDH活性の低下した変異株10-812株に、アグリカルチュラル・アンド・バイオロジカル・ケミストリー、第49巻、第2091頁、(1985年)に記載の方法にしたがい、形質転換した。形質転換株は、アンビシリソ $50 \mu\text{g/ml}$ を含むYPD寒天培地 (グルコース3%、酵母エキス0.5%、ポリベプトン0.2%、寒天2%、pH6.5)で選択した。選択培地に生育したアンビシリソ耐性株のプラスミドをアグリカルチュラル・アンド・バイオロジカル・ケミストリー、第49巻、第2083頁、(1985年)の方法に準じて調べた。導入されたプラスミドの大きさは 約2.1キロベースで、制限酵素解析より、pUC18と第1図に示された遺伝子断片およびアセトバクター・アセチ・サブスピーチ・キシリナムIFO 3288の約2.1キロベースの大きさのプラスミドの3者のキメラプラスミドであることを確認した。

(酵酸菌形質転換株の性質)

上記で得られたアセトバクター・アセチの形質

転換株について、ウエスタン法でALDH蛋白の生成量を調べた。まず、YPD液体培地 (上記のYPD寒天培地から寒天を除いた組成の培地) に $30 \mu\text{g/ml}$ の濃度でアンビシリソを加え、30°Cで36時間振とう培養した。培養後、集菌し、マクイルバインバッファー (pH6.0) に菌体を懸濁し、フレンチ・プレスで菌体を破碎した。破碎液から、未破碎菌体を遠心分離 (5,000rpm, 10分) で除き、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した。泳動後、ウエスタン法で、抗ALDH抗体と特異的に反応する蛋白質の生成を調べたところ、分子量約70,000の蛋白と抗体が強く反応していた。一方、プラスミドを有しない株では、抗体と反応する蛋白の生成はほとんど見られなかった。また、形質転換株のALDHの酵素活性を実施例1に記載の方法で測定したところ、プラスミドをもたない株の比活性が0.15に対し、形質転換株では、0.43であり、約3倍の活性の上昇が認められた。生産された抗ALDH抗体と反応する蛋白の分子量が本来のALDHの分子量より大きいのは、実施例1の大腸菌と同じく融合蛋白

の形で生産されているためと考えられる。分子量は、本米の大きさよりも大きいが、酵素活性を示しており、実用上問題はない。上記のごとく酵酸菌をALDHの構造遺伝子を含む遺伝子で形質転換することにより、活性をもったALDHの菌体含量を高めることができる。

特開平2-2364(7)

(実施例3)

(静酸菌形質転換株を用いた静酸発酵)

実施例2で得られたALDIの構造遺伝子を含む遺伝子断片と大腸菌プラスミドpUC18と静酸菌プラスミドの3者のキメラ・プラスミドをアセトバクター・アセチ・サブスピーチ・キシリナム IF03288にアグリカルチュラル・アンド・バイオロジカル・ケミストリー、第48巻、第2091頁(1985年)に記載の方法にしたがい、形質転換した。形質転換株は、アンピシリン500 μ g/mlを含む実施例2で組成の示されているYPG寒天培地で選択した。

選択培地に生育したアンピシリン耐性株のプラスミドを実施例2の方法に準じて調べたところ、約8.3キロベースの大きさのキメラプラスミドを保持していることを確認した。キメラプラスミドを保持する形質転換株とプラスミドをもたない元株との静酸発酵能を比較した。50mlミニ・ジャーでの発酵経過を第2回に示す。

培地は、実施例2のYPG寒天培地にエタノール、静酸を適量添加したものを使用した。ジャーの

実験量は3Lとし、500rpm、0.2vvmの条件で通気搅拌培養した。培養温度は、30°Cであった。第2回の発酵経過の結果から、形質転換株と元株の静酸発酵能を比較した。第1表に示すように、菌の比増殖速度、単位液量あたりの生産速度、最終到達酸度のいずれにおいても形質転換株では、顕著に向上了していた。また、酸度4%で連続静酸発酵をおこなったところ、元株では、毎時150mlの流量で、定常状態になったのに対し、形質転換株では、毎時250mlの流量まで連続発酵が可能であった。

第1表

	元株	形質転換株
比増殖速度(1) (%/hr)	0.072	0.143
生産速度(2) (%/hr)	0.18	0.40
最高到達酸度 (%)	6.84	9.66

(1) 酸度3%の時

(2) 酸度2%の時

実施例4. 細胞膜結合型アルデヒド脱水素酵素の構造遺伝子の塩基配列およびアミノ酸配列の決定

実施例1で得た大腸菌形質転換株E. coli AL25の保有するプラスミドを実施例1のアルカリ溶菌法で抽出し得た。得られたプラスミドをEco RIで切断して得られる第1回に別紙酵素地図を示す約3.6キロベースの遺伝子断片についてN13ファージを用いたジテオキシ法(Methods in Enzymology、第10巻、第20頁、Academic Press、New York、1983年)によって、その塩基配列を決定した。決定した塩基配列をもとに翻訳可能な領域を検索したところ、第3回に示すようなATG翻訳開始コドンから翻訳される2319塩基からなるアミノ酸773残基(分子量84,135)をコードする翻訳可能な領域が見出された。(第3回の塩基配列から決定されたアミノ酸配列を第3回の塩基配列の下段に示した。)第3回の塩基配列で示されるポリペプチドが、本発明の細胞膜結合型アルデヒド脱水素酵素と一致することは、精製した本発明の細胞膜結合型アルデヒド脱水素酵素をエドマン分解によって決定さ

れたアミノ末端側アミノ酸配列10個(Asn-Gln-Ile-Phe-Pro-Leu-Asp-Arg-Ser-Leu)と塩基配列から見出されたアミノ末端側から第45番目以降のアミノ酸配列と完全に一致することから、確認された。塩基配列から見出されたアミノ末端側から第44番目までのアミノ酸配列は、エドマン分解によって決定されたアミノ酸配列には見られないことから、細胞膜結合型アルデヒド脱水素酵素の分泌に関与する領域と思われた。

4. 図面の簡単な説明

第1回は細胞膜結合型アルデヒド脱水素酵素の構造遺伝子の側鎖酵素地図を示し、第2回は実施例3における元株と形質転換株の静酸発酵の比較を示す図であり、第3回は、上段は細胞膜結合型アルデヒド脱水素酵素の構造遺伝子の塩基配列を示す図で、下段は細胞膜結合型アルデヒド脱水素酵素の構造遺伝子のアミノ酸配列を示す図である。

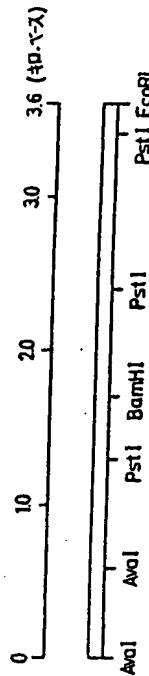
アミノ酸配列における略記号の意味は次のとおりである。

特開平2-2364 (8)

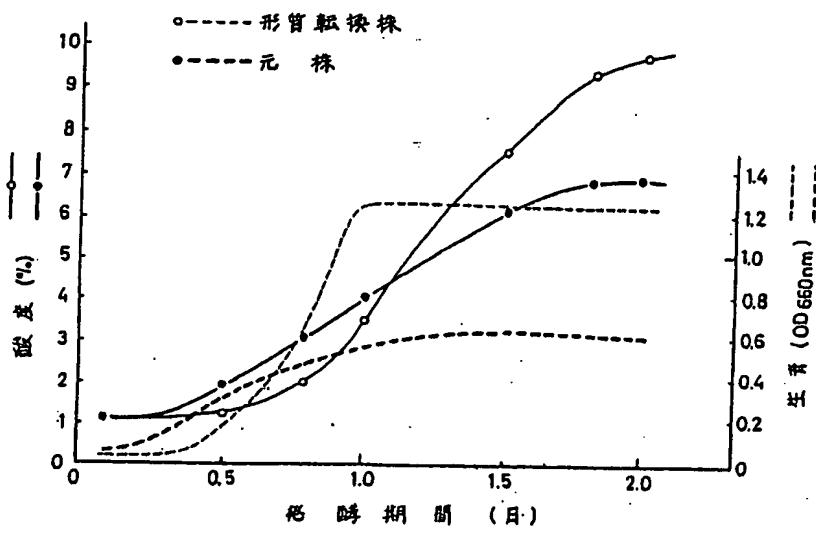
Met メチオニン	Ala アラニン
Arg アルギニン	Asn アスパラギン
Asp アスパラギン酸	Cys システイン
Gln グルタミン	Glu グルタミン酸
Gly グリシン	His ヒスチジン
Ile イソロイシン	Leu ロイシン
Lys リシン	Phe フェニルアラニン
Pro プロリン	Ser セリン
Thr スレオニン	Trp リトリプトファン
Tyr チロシン	Val バリリン

代理人 弁理士 戸 田 誠 男

第 1 図



第 2 図



第3図-1

1 ATG.GGT.AGA.TTA.AAC.CGC.TTC.CGC.CTT.GGC.AAG.GAC.GGG.CGC.CGT.GAA.CAG.GCT.TCC.CTG
 MET-Gly-Arg-Leu-Asn-Arg-Phe-Arg-Leu-Gly-Lys-Asp-Gly-Arg-Glu-Gln-Ala-Ser-Leu
 61 TCA.CGT.CGC.GGC.TTC.CTT.GTC.ACC.TCC.CTT.GGC.GCC.GGC.GTC.ATG.TTC.GGC.TTC.GCG.CGT
 Ser-Arg-Arg-Gly-Phe-Leu-Val-Thr-Ser-Leu-Gly-Ala-Gly-Val-MET-Phe-Gly-Phe-Ala-Arg
 121 CCT.TCA.TCC.GCC.AAC.CAG.ATT.TTC.CCG.CTC.GAC.CGG.TCG.CTG.CCG.GGT.GAC.GGG.GCG.TTC
 Pro-Ser-Ser-Ala-Asn-Gln-Ile-Phe-Pro-Leu-Asp-Arg-Ser-Leu-Pro-Gly-Asp-Gly-Ala-Phe
 181 GAA.CCC.ACC.ATC.TGG.TGT.TCG.ATC.GCA.CCC.GAT.GGG.GAA.ATC.ACG.GTC.AAC.ATC.ATC.CGC
 Glu-Pro-Thr-Ile-Trp-Cys-Ser-Ile-Ala-Pro-Asp-Gly-Glu-Ile-Thr-Val-Asn-Ile-Ile-Arg
 241 GCG.GAA.ATG.GGC.CAG.CAT.ATC.GGC.ACC.GCC.CTT.GCC.CGC.ATC.ATC.GCG.GAT.GAA.ATG.GAA
 Ala-Glu-MET-Gly-Gln-His-Ile-Gly-Thr-Ala-Leu-Ala-Arg-Ile-Ile-Ala-Asp-Glu-MET-Glu
 301 GCC.GAC.TGG.AGC.AAG.GTC.CGC.ATC.AAC.TAC.GTG.GAC.ACC.GAC.CCC.AAA.TGG.GGG.CTG.ATG
 Ala-Asp-Trp-Ser-Lys-Val-Arg-Ile-Asn-Tyr-Val-Asp-Thr-Asp-Pro-Lys-Trp-Gly-Leu-MET

第3図-2

361 GTT.ACC.GGT.GGC.AGC.TGG.TCG.GTG.TGG.ATG.ACA.TGG.GAC.GTC.TTC.CGC.CAG.GCT.GGC.GCC
 Val-Thr-Gly-Ser-Trp-Ser-Val-Trp-MET-Thr-Trp-Asp-Val-Phe-Arg-Gln-Ala-Gly-Ala
 421 GCG.ACG.CGC.ACG.GCC.ATG.GTC.GAA.GAA.GGC.GCC.CGC.CTG.CTG.GGC.ACC.ACG.CCG.GAC.AAG
 Ala-Thr-Arg-Thr-Ala-MET-Val-Glu-Glu-Gly-Ala-Arg-Leu-Leu-Gly-Thr-Thr-Pro-Asp-Lys
 481 TGC.ACG.GTC.GCC.AGC.AGC.ATC.GTC.AGT.GCC.GGT.GGC.AAG.CAG.ATC.AGC.TTC.GGC.GAC.ATC
 Cys-Thr-Val-Ala-Ser-Ser-Ile-Val-Ser-Ala-Gly-Gly-Lys-Gln-Ile-Ser-Phe-Gly-Asp-Ile
 541 GTG.GCC.AAG.GGG.CAT.CCG.TCC.CAT.GCC.TTC.ACG.CCC.GAG.GAA.ATG.GCC.AAG.CTG.CCG.CTC
 Val-Ala-Lys-Gly-His-Pro-Ser-His-Ala-Phe-Thr-Pro-Glu-Glu-MET-Ala-Lys-Leu-Pro-Leu
 601 AAG.CCC.GCC.AGC.GAA.CCG.AGG.CTG.ATC.GGC.AAT.GCC.GAA.CTC.AAG.GCG.CTG.GAC.ATT.CCG
 Lys-Pro-Ala-Ser-Glu-Arg-Asn-Ile-Gly-Asn-Ala-Glu-Leu-Lys-Ala-Leu-Asp-Ile-Pro
 661 GCC.AAG.ACC.AAC.GGC.ACG.GCC.ATC.TAT.GGC.ATC.GAC.GCC.AAG.GTG.GAA.GGC.ATG.CTG.TAC
 Ala-Lys-Thr-Asn-Gly-Thr-Ala-Ile-Tyr-Gly-Ile-Asp-Ala-Lys-Val-Glu-Gly-MET-Leu-Tyr

特開平2-2364 (10)

第3図-3

721 GGC.CGC.CCC.AAG.ATG.CCG.ACG.CGC.TAT.GGC.TCC.AAG.GTC.CGT.TCG.GTT:GAC.GAT.ACC
 Gly-Arg-Pro-Lys-MET-Pro-Pro-Thr-Arg-Tyr-Gly-Ser-Lys-Val-Arg-Ser-Val-Asp-Asp-Thr
 781 GAG.GCC.AAG.AAG.ATC.AAG.GGC.TAT.GTC.CGC.TAC.CTG.CTG.ATC.GAT.GAT.CCG.TCG.CAG.GTC
 Glu-Ala-Lys-Lys-Ile-Lys-Gly-Tyr-Val-Arg-Tyr-Leu-Leu-Ile-Asp-Asp-Pro-Ser-Gln-Val
 841 GTG.CAG.GGC.TGG.GTC.GTG.CTG.GCG.GAA.AGC.TAC.AGC.GCC.GCC.ATC.CGC.GCG.ACC.GAT
 Val-Gln-Gly-Trp-Val-Val-Leu-Ala-Glu-Ser-Tyr-Ser-Ala-Ala-Ile-Arg-Ala-Thr-Asp
 901 GCG.CTG.AAG.GTT.GAA.TGG.ACG.CCG.GGT.GAG.ACG.ATC.CAC.ACG.TCC.GAA.CGC.GAC.ATT.CAG
 Ala-Leu-Lys-Val-Glu-Trp-Thr-Pro-Gly-Glu-Thr-Ile-His-Thr-Ser-Glu-Arg-Asp-Ile-Gln
 961 GAC.CGT.GGC.CGC.GAA.CTG.ATC.AAC.AAC.AAG.GCA.GGC.GGC.GTC.TAC.ATC.TTC.AAT.GAT.GAT
 Asp-Arg-Gly-Arg-Glu-Leu-Ile-Asn-Asn-Lys-Ala-Gly-Gly-Val-Tyr-Ile-Phe-Asn-Asp-Asp
 1021 GGC.GTG.GAC.CAG.GCC.TTT.GGC.AGT.GCG.CAT.ACG.GTC.ATG.GAT.CAG.GAA.TAT.ACC.TGT.GCA
 Gly-Val-Asp-Gln-Ala-Phe-Gly-Ser-Ala-His-Thr-Val-MET-Asp-Gln-Glu-Tyr-Thr-Cys-Ala

第3図-4

1081 TCC.GTG.CTG.CAT.TAC.CAG.CTG.GAA.CCG.ACC.AAC.GCG.CTG.GCC.TTT.GAA.AAG.GAC.GGT.GTT
 Ser-Val-Leu-His-Tyr-Gln-Leu-Glu-Pro-Thr-Asn-Ala-Leu-Ala-Phe-Glu-Lys-Asp-Gly-Val
 1141 TAC.GAA.ATC.CAC.GCG.GGT.AAC.CAG.TGG.CAG.AGC.CTG.ATC.CTG.CCC.ACG.CTG.GCC.AAG.TCG
 Tyr-Glu-Ile-His-Ala-Gly-Asn-Gln-Trp-Gln-Ser-Leu-Ile-Leu-Pro-Thr-Leu-Ala-Ser
 1201 CTG.CAG.GTG.CCT.GAA.AGC.AAG.GTC.ATC.CTG.CGC.AGC.TAC.CTG.CTG.GGT.GGC.GGG.TTT.GGC
 Leu-Gln-Val-Pro-Glu-Ser-Lys-Val-Ile-Leu-Arg-Ser-Tyr-Leu-Gly-Gly-Phe-Gly
 1261 CGC.CGG.CTG.AAC.GGG.GAT.TAC.ATG.ATC.CCG.GCC.GCC.CTT.GCG.TCC.AAG.GCG.CTG.GGC.GGC
 Arg-Arg-Leu-Asn-Gly-Asp-Tyr-MET-Ile-Pro-Ala-Ala-Leu-Ala-Ser-Lys-Ala-Leu-Gly-Gly
 1321 AAG.CCG.GTC.AAG.CTG.ATC.CTG.ACG.CGG.TCG.GAT.GAC.ATG.CAG.TTC.GAT.TCC.TTC.CGC.TCG
 Lys-Pro-Val-Lys-Leu-Ile-Leu-Thr-Arg-Ser-Asp-Asp-MET-Gln-Phe-Asp-Ser-Phe-Arg-Ser
 1381 CCT.TCG.GTC.CAG.CGT.GTC.CGC.ATG.GCG.TTC.GAC.GCC.AGC.GAC.AGG.ATC.ACC.GCC.ATG.GAT
 Pro-Ser-Val-Gln-Arg-Val-Arg-MET-Ala-Phe-Asp-Ala-Ser-Asp-Arg-Ile-Thr-Ala-MET-Asp

第3図-5

1441 TAC.CAG.GCC.GCT.GCG.GGC.TGG.CCC.ACG.GGC.GTG.ATG.GCC.GAA.GCG.TTT.ATG.GAA.AAG.GGC
 Tyr-Gln-Ala-Ala-Ala-Gly-Trp-Pro-Thr-Gly-Val-MET-Ala-Glu-Ala-Phe-MET-Glu-Lys-Gly
 1501 GTG.GAT.GGC.AAG.CCG.TAT.GAC.CAG.TTC.GCC.ATC.GCT.GGT.GGC.GAC.CAC.TGG.TAC.GAA.GTC
 Val-Asp-Gly-Lys-Pro-Tyr-Asp-Gln-Phe-Ala-Ile-Ala-Gly-Gly-Asp-His-Trp-Tyr-Glu-Val
 1561 GGT.GCC.TTC.CGG.GTG.CGT.GCG.CTG.CGT.AAT.GAC.CTG.GCG.GAA.AAG.ACA.TTC.CGT.CCC.GGC
 Gly-Ala-Phe-Arg-Val-Arg-Ala-Leu-Arg-Asn-Asp-Leu-Ala-Glu-Lys-Thr-Phe-Arg-Pro-Gly
 1621 TGG.CTG.CGT.TCG.GTC.AGC.CCC.GGC.TGG.ACC.AGC.TGG.GGG.GTC.GAG.TGC.TTC.CTT.GAT.GAA
 Trp-Leu-Arg-Ser-Val-Ser-Pro-Gly-Trp-Thr-Ser-Trp-Gly-Val-Glu-Cys-Phe-Leu-Asp-Glu
 1681 GTC.GCG.CAC.CGC.CAG.AAG.AAG.GAT.CCT.GCG.CAG.TTC.CGT.CTT.GAA.CTG.TTG.ACC.GGG.CAG
 Val-Ala-His-Arg-Gln-Lys-Lys-Asp-Pro-Ala-Gln-Phe-Arg-Leu-Glu-Leu-Thr-Gly-Gln
 1741 GGC.CGT.AAC.AAG.GGG.CAG.GCG.CCC.GAT.TCC.GTC.GGT.GGC.GCG.CTG.CGT.CAG.GCC.GCT.GTC
 Gly-Arg-Asn-Lys-Gly-Gln-Ala-Pro-Asp-Ser-Val-Gly-Gly-Ala-Leu-Arg-Gln-Ala-Ala-Val

第3図-6

1801 GTG.CGC.AGG.CTT.ATG.GAA.AAG.GTG.AAC.TGG.GGC.AAG.ACC.AGC.CTG.CCC.AAG.GAC.ACC.GCG
 Val-Arg-Arg-Leu-MET-Glu-Lys-Val-Asn-Trp-Gly-Lys-Thr-Ser-Leu-Pro-Lys-Asp-Thr-Ala
 1861 ATG.GGC.CTT.GCC.ACC.ACG.GCG.GGG.CAG.GAA.CGC.GGC.ATG.CCG.ACG.TGG.GAT.CGG.TGT.GTG
 MET-Gly-Leu-Ala-Thr-Thr-Ala-Gly-Gln-Glu-Arg-Gly-MET-Pro-Thr-Trp-Asp-Arg-Cys-Val
 1921 GCG.CAG.GTG.CAT.GTG.GAC.CGC.AGC.ACG.GGC.GTC.GTG.ACA.TGC.CAG.AAG.CTG.ACC.ATC.CTG
 Ala-Gln-Val-His-Val-Asp-Arg-Ser-Thr-Gly-Val-Val-Thr-Cys-Gln-Lys-Leu-Thr-Ile-Leu
 1981 GTC.GAT.GCG.GGT.ACC.GTG.GTT.GAC.CCC.GAT.GGC.GCG.AAG.GCC.CAG.ACC.GAG.GGT.GCT.GCG
 Val-Asp-Ala-Gly-Thr-Val-Val-Asp-Pro-Asp-Gly-Ala-Lys-Ala-Gln-Thr-Glu-Gly-Ala-Ala
 2041 CTG.TGG.GGC.CTG.AGC.ATG.GTC.CTG.TTC.GAG.AAC.ACG.GAA.ATC.GTC.AAC.GGC.ATG.CCG.GTT
 Leu-Trp-Gly-Leu-Ser-MET-Val-Leu-Phe-Glu-Asn-Thr-Glu-Ile-Val-Asn-Gly-MET-Pro-Val
 2101 GAC.CGT.AAC.CTG.AAC.ACC.TAT.ACG.CCA.CTG.CGT.ATT.GCC.GAC.ACG.CCG.GAA.ATG.GAC.ATC
 Asp-Arg-Asn-Leu-Asn-Thr-Tyr-Thr-Pro-Leu-Arg-Ile-Ala-Asp-Thr-Pro-Glu-MET-Asp-Ile

第3回 - 7

2161
 GAG.TTC.CTG.CCC.AGC.ACC.GAA.AAG.CCG.ATG.GGT.CTG.GGT.GAA.CCG.GGC.ACG.ACG.GTG.GTC
 Glu-Phe-Leu-Pro-Ser-Thr-Glu-Lys-Pro-MET-Gly-Leu-Gly-Glu-Pro-Gly-Thr-Thr-Val-Val
 2221
 GGT.CCT.GCA.ATC.GGC.AAC.GCC.ATA.TTC.AAT.GCC.GTG.GGT.GTC.CGC.CTG.CGT.CAT.ATG.CCG
 Gly-Pro-Ala-Ile-Gly-Asn-Ala-Ile-Phe-Asn-Ala-Val-Gly-Val-Arg-Leu-Arg-His-MET-Pro
 2281
 GTC.CGT.CCG.GCG.GAT.GTG.CTG.CGC.GGC.CTG.CAG.AAC.GGC
 Val-Arg-Pro-Ala-Asp-Val-Leu-Arg-Gly-Leu-Gln-Asn-Gly

第1頁の続き

②Int. Cl. * 識別記号 庁内整理番号
 //C 12 N 15/53
 (C 12 R 1:02)
 (C 12 N 1/21)
 (C 12 R 1:02)
 (C 12 P 7/54)
 C 12 R 1:02

②発明者 川村 吉也 愛知県江南市古知野町古渡132